

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



PCT



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Agosto de 2006 (03.08.2006)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/079864 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

Comp, lejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo
(CHU, JC) e Instituto de Ciencias de la Salud, Universid,
ad de la Coruña, As Xubias, 84, 15006 La Coruña (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2005/000187

(74) Mandatario: **CARPINTERO LÓPEZ, Francisco**; Her-
rero & Asociados, S.L., Alcalá, 35, E-28014 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de Enero de 2005 (26.01.2005)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible*): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400163 26 de Enero de 2004 (26.01.2004) ES

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID [ES/ES];
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, C/Einstein, 3, 28049
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **GOS-
ALVES BERENGUER, Jaime** [ES/ES]; Departamento
de Biología Unidad de Genética Ciudad, Universitaria de
Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, C/Dar-
win, 2, 28049 Madrid (ES). **FERNANDEZ GARCIA,
José Luis** [ES/ES]; Sección de Genética y Unidad de
Investigación Comp, lejo Hospitalario Universitario Juan
Canalejo (CHU, JC) e Instituto de Ciencias de la Salud,
Universid, ad de la Coruña, As Xubias, 84, 15006 La
Coruña (ES). **GOYANES VILLAESCUSA, Vicente**
[ES/ES]; Sección de Genética y Unidad de Investigación

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

(54) Title: A METHOD FOR DETERMINATION OF DNA FRAGMENTATION IN ANIMAL SPERM CELL

(54) Título: UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE LA FRAGMENTACION DEL AND EN ESPERMATO-
ZOIDES DE ANIMALES

(57) Abstract: The present invention describes a method for the determination of DNA fragmentation in animal sperm cells. Spe-
cially it is related to a method to evaluate the integrity of the chromatin/DNA of the sperm cells by means of the sample treatment
with a denaturing DNA solution followed, optionally, of a staining; a later treatment with a lysing solution which does not contain
protein denaturing detergent, followed optionally by a staining; and an evaluation of the integrity of the chromatin/DNA. The present
invention is furthermore related to a kit to evaluate the quality of the animal sperm cells which includes a denaturing DNA solution
and a lysing solution which does not contain protein denaturing detergent.

(57) Resumen: La presente invención describe un procedimiento para la determinación de la fragmentación del ADN en esper-
matozoides de animales. Particularmente se refiere a un procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los
espermatozoides mediante un tratamiento de la muestra con una solución desnaturalizante del ADN seguida, opcionalmente de una
tinción; un posterior tratamiento con una solución de lisis que no contiene detergente desnaturalizante de proteínas, seguida, opcio-
nalmente de una tinción; y una evaluación de la integridad de la cromatina/ADN. La presente invención se refiere además a un kit
para evaluar la calidad de los espermatozoides de animales que incluye una solución desnaturalizante del ADN y una solución de
lisis que no contiene detergente desnaturalizante de proteínas.

WO 2006/079864 A1

UN PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN ESPERMATOZOIDES DE ANIMALES

5

DESCRIPCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 Esta invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente aquel relacionado con la biología de la reproducción, en especial está dirigida a procedimientos y métodos para la determinación de la calidad del semen en animales.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad el 6% de los varones de países occidentales, en edad fértil, presentan algún tipo de patología que les impide una reproducción normal. A este efecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha conjuntado en un único
20 protocolo una serie de procedimientos de laboratorio que estandariza en el ámbito internacional el análisis de la calidad del semen. Estos estudios se centran en la determinación de la concentración, morfología y motilidad de los espermatozoides, complementada con la posible valoración de ciertas pruebas funcionales, así como de determinados parámetros bioquímicos y enzimáticos del semen (WHO, 1999). Con este
25 conjunto de pruebas se llega a estimar el volumen total del mismo y la concentración de espermatozoides por mililitro y se puede diagnosticar si la infertilidad del varón es debida a una ausencia (azoospermia) o a una disminución clara (oligospermia) de la cantidad de espermatozoides en el eyaculado. Igualmente, se determina la posible existencia de problemas de motilidad (astenozoospermia) que imposibilita que estas
30 células atraviesen la cavidad uterina y alcancen con éxito el tercio externo de las trompas. También se analiza si presentan problemas graves de morfología de sus

componentes (cabeza, cuello, cola) (teratozoospermia) dado que estas variaciones repercuten en la capacidad para una fertilización eficaz del óvulo femenino. Complementariamente, se explora asimismo la participación de glándulas como la próstata y las vesículas seminales (infecciones, agenesias). Por último, pruebas
5 funcionales como el HOS test (permeabilidad iónica de membrana celular) o la capacidad de progresión de los espermatozoides *in vitro*, dan una idea de la capacidad fértil del semen. Finalmente, estos estudios de laboratorio precisan, ocasionalmente, completarse con perfiles hormonales, biopsia del testículo y/o la determinación del cariotipo (estudio cromosómico que define la condición heredada del sexo masculino o
10 femenino de un individuo) y/o pruebas de genética molecular.

A pesar de los estudios clínicos y de laboratorio, la causa de la infertilidad no se puede determinar en alrededor del 30-50% de los varones infértiles, siendo etiquetada como infertilidad idiopática. Recientemente, se ha reconocido que el daño del ADN de
15 los espermatozoides puede ser la explicación de un elevado porcentaje de estos casos idiopáticos (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000), de tal modo que el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es un tema de investigación activa con publicaciones continuas al respecto en las revistas especializadas (Evenson et al., 2002). Las anomalías de la cromatina o bien el daño en el ADN nuclear de los
20 espermatozoides, podría tener lugar o bien ser el resultado de anomalías en el empaquetamiento del ADN que acontece durante la espermiogénesis (Sailer et al., 1995). También cabe la posibilidad de que sean el resultado de daño producido por radicales libres que provocan estrés oxidativo (Aitken et al., 1998), o consecuencia de un posible proceso de apoptosis (Gorczyca et al., 1993).

25

Existen diferentes metodologías para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides humanos. Entre ellas se destacan el etiquetado de roturas del ADN *in situ* introduciendo nucleótidos marcados en las mismas utilizando enzimas como la transferasa terminal (TUNEL) o la ADN polimerasa (in situ nick translation
30 ISNT) (Gorczyca et al., 1993). Estas metodologías se basan en el empleo de enzimas sobre los espermatozoides fijados en portaobjetos. Por dicho motivo su eficacia no es

muy alta, resultando sólo marcadas aquellas roturas accesibles a la enzima, lo cual se traduce en una reproducibilidad relativamente baja de los resultados. Además, los reactivos son caros, por lo que estas técnicas sólo se aplican en estudios de investigación, no siendo posible utilizarlas para la valoración clínica del semen. Otra

5 técnica es el ensayo de cometas (Hughes et al., 1996). Los espermatozoides se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se someten a soluciones lisantes para extraer las membranas y las proteínas. Se obtienen así nucleoides, es decir, núcleos desproteinizados, en los que los bucles de ADN se han relajado por la descompactación. Los nucleoides se someten a una electroforesis en una cubeta rellena de solución

10 tampón, de tal modo que las fibras de ADN migran hacia el ánodo, constituyendo una imagen de cometa, con una cabeza y una cola en la dirección de la migración electroforética. Estos cometas se tiñen con un colorante fluorescente, para ser observados mediante microscopía de fluorescencia. Si el núcleo presenta fragmentación del ADN, gran cantidad de fragmentos del mismo habrán migrado, concentrándose en la

15 cola del cometa. Se trata de un test bastante sensible, pero relativamente caro y complicado para un laboratorio clínico convencional. De hecho, requiere cierto instrumental no común: fuente y cubeta de electroforesis, microscopía de fluorescencia, y un sistema de captación de las imágenes y de análisis de las mismas. Por todo ello tampoco es aplicable al estudio clínico del semen y sólo se utiliza con fines de

20 investigación.

La técnica de referencia actual para el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es el ensayo de estructura de la cromatina de Evenson (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay; Evenson et al., 1980; 2000; Evenson y Jost, 1994).

25 En esta técnica, los espermatozoides en suspensión se someten a una solución desnaturalizante ácida. Aquellos espermatozoides sin roturas en su ADN son resistentes a dicha desnaturalización, permaneciendo como ADN de cadena doble. Sin embargo, los espermatozoides con ADN fragmentado sí desnaturalizan su ADN, transformándose en ADN de cadena sencilla. Posteriormente se tiñen con naranja de acridina. Este

30 colorante emite fluorescencia verde cuando se une al ADN de cadena doble. Sin embargo, en los espermatozoides con ADN desnaturalizado, en cadena simple, este

fluorocromo emite fluorescencia roja. Los espermatozoides con ADN fragmentado se cuantifican usando un citómetro de flujo, para discriminar ambos tipos de fluorescencia. El SCSA es una técnica con gran proyección clínica, habiendo sido evaluada con profusión en muestras de pacientes. Usando este sistema, se ha establecido que cuando
5 el individuo presenta el 30% o más de los espermatozoides con ADN fragmentado, su probabilidad de conseguir un embarazo a término es menor del 1%, y esto tanto en fecundación natural como mediante técnicas de reproducción asistida (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000).

10 El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado puede ser más o menos constante en los diferentes ciclos espermatogénicos del individuo, pero también puede variar a consecuencia de factores exógenos, o por ejemplo tras un episodio febril intenso, como una gripe (Evenson et al., 2000). De este modo se pueden hacer estudios seriados, seleccionando aquellas muestras con menor nivel de fragmentación, para ser
15 utilizadas posteriormente en las técnicas de reproducción asistida. Es importante tener en cuenta que la congelación de las muestras de semen en nitrógeno líquido no modifica los niveles de fragmentación del ADN, por lo que se puede realizar el test sobre muestras congeladas, que después se pueden emplear en inseminación, FIV (fecundación in vitro) o ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides). Esto
20 supone una gran ventaja operativa para el paciente y para el laboratorio.

La técnica SCSA, aunque robusta y altamente reproducible, es un sistema muy caro, difícil de implementar, y poco accesible para el laboratorio básico (De Jonge, 2002). De esta forma, la calidad del ADN de los espermatozoides continúa sin ser
25 evaluada rutinariamente, a pesar de su contrastado valor clínico en el estudio de la infertilidad.

Recientemente, nuestro grupo de investigación describió de modo preliminar una técnica que permitía dispersar in situ la cromatina de los espermatozoides humanos, demostrando que aquellos espermatozoides incapaces de dispersar la cromatina
30 contenían ADN fragmentado (Fernández, J.L. et al. *Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 p.59-66: "The sperm Chromatin Dispersion Test: a simple method for the

determination of sperm DNA fragmentation"). Mediante este método se tratan secuencialmente las muestras de semen en microgel de agarosa con una solución ácida desnaturalizante, con dos soluciones de lisis y con una de lavado para después ser secadas y teñidas. Esta técnica, que se denominó test de Dispersión de la Cromatina del Espermatozoide (SCD: Sperm Chromatin Dispersion), emplea reactivos y condiciones excesivamente agresivas. El método descrito no da resultados consistentes lo que dificulta la evaluación reiterada. Por otro lado la calidad y contraste de las imágenes obtenidas y la reproducibilidad de los resultados no son lo suficientemente buenos para que se pueda aplicar comercialmente. Además, la estructura de los espermatozoides se ve afectada y la cola deja de ser visible en las muestras. Este problema es importante, ya que no se pueden distinguir con facilidad los espermatozoides de otro tipo de células presentes en la muestra, con el consiguiente error en la cuantificación del número de espermatozoides con cromatina/ADN dañado.

Por lo tanto aún subsiste la necesidad de un proceso fiable que pueda ser utilizado de una forma rutinaria y sencilla para el estudio de la calidad del semen de animales y en particular para evaluar la integridad de la cromatina/ADN. El proceso tiene que ser robusto, fácil de implementar, barato y accesible al laboratorio básico. Tiene que resolver los problemas anteriormente mencionados. Además, tiene que dar resultados homogéneos entre distintos laboratorios y ser susceptible de automatización.

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la invención es un procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides de animales de forma rápida y precisa y que pueda ser incorporado en la actividad rutinaria de cualquier laboratorio de análisis, veterinario o específico de la reproducción humana.

Así pues un objeto de la invención es un procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal que comprende:

- a) una etapa de tratamiento de la muestra conteniendo los espermatozoides, con una solución desnaturalizante del ADN,
- b) una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,
- 5 c) una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides, caracterizado porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides.

10 En general se prefiere que la etapa a) preceda a la b).

Como se indica la selección de la solución de lisis es crítica para alcanzar los objetivos de la invención. Entre los detergentes desnaturalizantes de proteínas que no se deben utilizar tenemos los detergentes aniónicos o catiónicos como por ejemplo SDS, dodecilsulfato, sulfonato de alquilbenceno, sal hidratada del ácido glicocólico, etc. Son
15 detergentes que provocan una gran disrupción de membranas, con efectos de lisis y a la vez son activos desnaturalizantes de proteínas. Se emplean en electroforesis desnaturalizante en las que se somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). Son activos sobre
20 todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas. Su actividad dentro de los detergentes es alta.

En el procedimiento de la invención preferentemente se utiliza un detergente no iónico no desnaturalizante de proteínas, es decir un detergente que solubiliza las
25 proteínas pero no las desnaturaliza. Entre ellos se prefiere el toctylfenoxipolietoxietanol (Triton X-100), N,N-Bis(3-D-gluconamidopropil) cholamida (BigCHAP), Brij(r) 35 P, N-decanoil-N-metilglucamina, digitonin, dodecanoyl-N-metilglucamida, heptanoil-N-metilglucamida, octilfenoxi poly(etileneoxi)etanol ramificado (Igepal CA-630), N-Nonanoil-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-Octanoil-N-metilglucamine, solución
30 Span 20, polisorbato 20 (Tween 20). Particularmente preferido es el Triton X-100 por los buenos resultados que da y su fácil disponibilidad.

Se prefiere que la solución de lisis tenga una fuerza iónica suficiente para facilitar el proceso de lisis sin desnaturalización. Hemos comprobado que una solución efectiva es la que contiene cloruro sódico entre 1 y 3 M, dithiothreitol (DTT) entre 0.001 y 2M, 2- amino-2 (hidroxymetyl)-1,3-propanediol (Tris) 0.001 y 2M y Triton X-100 entre 0.1 y 3%. Particularmente apropiada es una solución que contiene NaCl alrededor de 2.5M, DTT alrededor de 0.2M, Tris alrededor de 0.2M, Triton X-100 alrededor de 1% y pH alrededor de 7.5.

La solución desnaturalizante del ADN es preferentemente ácida, por ejemplo de un ácido seleccionado del grupo ácido clorhídrico, acético, nítrico o mezclas de éstos. De forma preferente es una solución de ácido clorhídrico.

El procedimiento de acuerdo a la invención tiene una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides después de las etapas a) y b). Aunque hay varias alternativas para esta evaluación, se prefiere que sea visual. Con este fin preferiblemente el procedimiento incluye una etapa de tinción de la muestra después de las etapas a) y b). Una tinción que da excelentes resultados y permite visualizar tanto la cola de los espermatozoides como el halo característico formado es una solución tipo Wright.

En una variante preferida los espermatozoides se incluyen en un medio similar a una suspensión, preferentemente en un microgel, especialmente en un microgel de agarosa.

25

La invención también se dirige a un Kit para la evaluación de la calidad de los espermatozoides de animales que comprende:

- a) una solución desnaturalizante del ADN,
- b) una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,

30

caracterizado porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides. El Kit permite llevar a cabo el procedimiento según la invención que se acaba de describir.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Parámetros utilizados para la definición del tamaño de los halos en espermatozoides humanos, según la metodología de la invención. 1a: El nucleoide, que
10 corresponde al núcleo masivamente desproteinizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominada “core”, en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN. La cola del espermatozoide es visible. 1b: Filtro de relieve para una mejor visualización y establecimiento de los límites entre el halo y el “core”. 1c: Diámetro menor del “core”
15 (a) y grosor del halo (b), como muestra de las medidas utilizadas para establecer los distintos tamaños de los halos, tal y como se explica en la metodología de la invención.

Figura 2. Distintos tipos de espermatozoides definidos según el tamaño del halo que se genera tras aplicar la metodología de la invención. 2a: Espermatozoide con halo de
20 tamaño grande. 2b: Espermatozoide con halo de tamaño mediano. 2c: Espermatozoide con halo de tamaño pequeño. 2d: Espermatozoide sin halo. 2e: Espermatozoide sin halo y degradado. 2f: Campo general en el que se observan los distintos tipos de espermatozoides anteriormente descritos.

25 Figura 3. Correlación entre los distintos tamaños de halo visualizados tras la tinción con DAPI (a-e, fluorescencia azul) y la señal de hibridación in situ utilizando una sonda de ADN humano genómico total, según la metodología de DBD-FISH (a'-e', fluorescencia roja) para visualizar el nivel de fragmentación del ADN. 3 a: Espermatozoide con halo y baja señal de hibridación (3 a'). 3b: Espermatozoide con halo mediano y baja señal de
30 hibridación, aunque discretamente mayor que en el caso anterior (3 b'). 3 c: Espermatozoide con halo pequeño y notable incremento en el nivel de hibridación (3

c'). 3 d: Espermatozoide sin halo y alto nivel de hibridación (3 d'). 3 e: Espermatozoide degradado y mostrando una distribución irregular de la hibridación (3 e').

- 5 Figura 4. Aplicación del método de la invención a muestras de espermatozoides de las siguientes especies: ratón (*Mus musculus*), toro (*Bos taurus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lombriz de tierra (*Lombricus terrestris*). 4a corresponde a toro; 4b,c,d corresponde a ratón; 4 e corresponde a la lombriz de tierra; 4 f corresponde al rodaballo.
- 10 Figura 5. Muestra de paciente con presencia de altos niveles de leucocitospermia. Se aprecia la ausencia de cola en los leucocitos, que permite diferenciarlos del resto de los tipos celulares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

Como se detallará, el procedimiento y Kit de la invención son un sistema sencillo y fiable para la determinación de la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado. La metodología es aplicable en los laboratorios de andrología y clínicas de reproducción asistida y laboratorios de reproducción animal. Además, se trata de un

20 sistema muy versátil ya que es posible congelar las muestras y analizarlas cuando interese, sin inducir cambios en los resultados del análisis.

El procedimiento de la invención, que permite evaluar la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal comprende:

25

a) una etapa de tratamiento de la muestra conteniendo los espermatozoides, con una solución desnaturizante del ADN;

b) una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer proteínas nucleares, que no contiene detergente desnaturizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides;

30

c) una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides.

Además de otras, las principales diferencias del procedimiento de la invención, con respecto al estado de la técnica y concretamente respecto a Fernández, J.L. et al. *Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 p.59-66, residen primordialmente en el
5 ámbito de la lisis y de la tinción. Así, se emplea una única solución de lisis, en vez de dos secuenciales. La composición es diferente puesto que no contiene ni SDS (detergente aniónico desnaturizante de proteínas) ni EDTA (agente quelante). Puede incorporar un detergente neutro relativamente suave, no desnaturizante, como Triton X-100.

10

Técnicamente éstas diferencias se traducen en la conservación de las colas de los espermatozoides. Es una mejora crucial, pues la detección de la misma es un dato morfológico indispensable para poder discriminar si las imágenes de nucleoides
15 provienen realmente de espermatozoides o corresponden a otros tipos celulares que pudieran estar presentes, por ejemplo, células descamadas de la vía génitourinaria, células inflamatorias, sanguíneas, etc. Esta persistencia se logra mediante una lisis celular mucho menos agresiva, así como descartando el empleo del SDS.

Además, la lisis más suave consigue el desplegamiento de los bucles de
20 cromatina manteniendo mejor la morfología de la cabeza previa, o “core”, y logrando unos halos de dispersión con mayor densidad de material cromatínico, resultando en una tinción más intensa de los mismos. En consecuencia, se mejora muchísimo el contraste y la discriminación visual de los diferentes tamaños de halo, especialmente cuando se utiliza la tinción de Wright.

25

Otra ventaja significativa es que la ausencia de detergente desnaturizante de proteínas, como el SDS, permite el uso secuencial de la técnica aquí descrita con otras que permiten visualizar otros componentes celulares. Así, sobre los nucleoides
30 obtenidos, según la metodología descrita, se pueden aplicar técnicas de inmunodetección de proteínas, del tipo de las lamininas y otras proteínas nucleares, así como detección de ARN asociado a la matriz nuclear, pues el ADN se extiende

manteniéndose la mayor cantidad de estructura nuclear posible. Esto es importante en ciertos temas de investigación de la estructura del núcleo del espermatozoide.

Otra ventaja adicional es que se utiliza una menor cantidad de reactivos y, por consiguiente, hay un menor gasto económico. Por ejemplo, el DTT es especialmente caro, y la reducción a la concentración descrita en los ejemplos (un cuarto de la descrita en el artículo) es importante para el coste.

De lo expuesto se desprende que el procedimiento a patentar resulta en imágenes de nucleoides de espermatozoides muy mejoradas y más reproducibles respecto al estado de la técnica. Es posible discriminar si los nucleoides provienen o no de espermatozoides maduros o de otros tipos celulares, y la categorización del tamaño del halo es mucho más precisa y segura. En consecuencia, con el procedimiento a patentar, la determinación de los niveles de fragmentación del ADN de la muestra es mucho más fiable, lo que hace que se pueda utilizar de forma rutinaria, sencilla y a un bajo coste. Su aplicación es pertinente en distintos laboratorios, tanto de ámbito clínico y sobre con muestras humanas, como en laboratorios veterinarios para el estudio de muestras animales. Esto es muy importante, pues se trata de un test de posible aplicación clínica a pacientes.

20

La secuencia de las etapas de tratamiento de la muestra se puede hacer en cualquier orden, primero con una solución desnaturalizante del ADN, seguida por la etapa de tratamiento con una solución de lisis o viceversa. Pero se prefiere tratar antes la muestra con la solución desnaturalizante del ADN y después con la solución de lisis ya que da mejores resultados. En la otra variante (lisis seguido de desnaturalización del ADN) los espermatozoides con ADN fragmentado se comportan de modo diferente. En este caso, dispersan fragmentos de cromatina/ADN, dando lugar a halos de mayor tamaño. Incluso un único tratamiento con una solución de lisis puede ser suficiente para observar este comportamiento, aunque la discriminación de los tamaños de halo no es muy precisa.

30

A continuación se detalla el procedimiento de la invención, junto con algunas variantes y etapas opcionales. El experto en la materia entenderá que hay otros modos de realización y posibilidades siempre que se mantengan los aspectos fundamentales que se describen.

5

El primer paso es la preparación de la muestra. Mediante los procedimientos habituales en éste campo se obtiene y se comprueba la concentración de espermatozoides de la muestra. La concentración adecuada para el análisis oscila entre 0.1 y 20 millones de células por mililitro. Si la muestra estuviese excesivamente
10 concentrada se ajusta a la concentración adecuada diluyéndola con medio de cultivo o con solución salina/fosfato tamponada (PBS) o similar.

La muestra de semen se debe poner sobre un soporte para su procesado según el procedimiento de la invención y para facilitar su evaluación. El soporte preferentemente
15 es un portabjetos de cristal que se puede recubrir con una película de agarosa estándar. Para ello, se prepara una solución de agarosa estándar entre 0.2 y 1% en agua destilada en una jarra de Coplin o similar. Se cubre con una lámina de plástico agujereada y se deposita en un horno microondas. Se regula el horno microondas a una potencia entre 300-1000W, por ejemplo 500W, agitando el envase ocasionalmente para una mejor
20 disolución de la agarosa, dejándola hasta que hierva. Este procedimiento también se puede realizar utilizando un baño termostático. Cuando la solución de agarosa se vuelva totalmente transparente, ya estará preparada para depositarla en recipientes verticales de un contenido entre 10 y 250 ml. Estos recipientes deberán estar previamente atemperados en un baño entre 60-100°C, por ejemplo 70°C, para mantener
25 la solución de agarosa en estado líquido.

Antes de introducir los portaobjetos en la solución de agarosa, estos se limpian frotando con un paño para eliminar posibles restos de impurezas. Los portaobjetos se sumergen verticalmente, sujetándolos con unas pinzas por la zona esmerilada, entre 1-
30 60 segundos, retirándolos y volviéndolos a sumergir entre una y diez veces, hasta formar una película homogénea sobre el portaobjetos. Estos, se depositan

horizontalmente sobre una superficie lisa y fría entre 1 y 15°C, preferentemente de 4°C, por ejemplo, de cristal o de metal. Esta placa, con los portaobjetos, se introduce en la nevera a 4°C durante un mínimo de 30 min, hasta que se comprueba que la solución de agarosa ha gelificado sobre la superficie del portaobjetos. Se retiran las bandejas de la nevera y se limpia la superficie de los portaobjetos que estaba en contacto con la placa con un papel secante. Seguidamente, los portaobjetos se introducen horizontalmente en una estufa en un rango de temperaturas de 37-100°C, hasta que la agarosa seque por completo y forme una película fina adherida al cristal. Los portaobjetos así tratados se pueden utilizar inmediatamente o almacenar en una caja bien cerrada a temperatura ambiente durante varios meses.

Para facilitar el procesamiento de la muestra que contiene los espermatozoides, ésta se puede incluir en un medio con características similares a las de una suspensión tal como por ejemplo un microgel de agarosa. En este caso se prepara una solución de agarosa de bajo punto de fusión (low melting/ low gelling) a una concentración comprendida entre el 0.5 y 2% en agua destilada. La fusión de esta agarosa se realiza utilizando un horno microondas o un baño termostatzado, y se mantiene posteriormente entre 30 y 37°C en un tubo introducido en un baño termostatzado o estufa. En un tubo Eppendorf o similar, se mezcla cuidadosamente el semen y la solución de agarosa, de manera que esta última quede a una concentración entre 0.3 y 1%. Por ejemplo, 70 microlitros de la solución de agarosa + 30 microlitros de la muestra. Es importante que la temperatura de la agarosa no sea superior a 37°, para no dañar a las células.

Finalmente, para obtener la muestra sobre soporte, se colocan los portaobjetos recubiertos sobre una superficie lisa y fría de cristal o de metal, con una temperatura que oscile entre 1 y 15°C, evitando formar burbujas de aire. Se recomienda depositar con una micropipeta una gota entre 5-200 microlitros de la mezcla, colocando un cubreobjetos encima de la gota. Como precaución, se recomienda procesar cada muestra por duplicado, y utilizar una muestra control cada vez que se aplique la técnica. La placa con los portaobjetos, se introduce en una nevera a 4°C, entre 2 a 30 minutos hasta

que se produzca una gelificación adecuada de la agarosa. Una vez que ha ocurrido la gelificación, se procede a retirar los cubreobjetos con mucha suavidad, dentro de la misma nevera y evitando que se dañe el microgel.

5 Una vez preparadas adecuadamente las muestras para su fácil y repetido manejo, se procede a su tratamiento de acuerdo al procedimiento de la invención con una etapa de tratamiento con una solución desnaturalizante del ADN y una etapa de tratamiento de lisis para extraer proteínas nucleares.

10 En una variante preferida se introducen primero los portaobjetos con la muestra en posición horizontal en un recipiente que contiene la solución desnaturalizante. La solución desnaturalizante del ADN puede ser ácida, por ejemplo una solución de ácido acético, ácido nítrico, ácido sulfúrico, o alcalina como por ejemplo una solución de hidróxido sódico, hidróxido bórico, hidróxido potásico, a concentraciones suaves. En
15 una variante preferida se utiliza una solución de ácido clorhídrico cuya concentración puede variar entre 0.01 y 0.5N, especialmente entre 0.1 y 0.3 N, particularmente preferida es una concentración alrededor de 0.2 N. Se recomienda que esta solución se prepare el mismo día de la realización del test y mantener los portaobjetos en incubación en la solución desnaturalizante del ADN entre 1 y 15 minutos a una
20 temperatura entre 1°C y 37°C, preferentemente 18°C-25°C, especialmente 20-22°C.

 Una vez finalizada esta parte del proceso, se procede a efectuar la lisis de las muestras con una única solución de lisis lo suficientemente suave para que no se destruyan las colas de los espermatozoides. Para ello, cada portaobjetos se sumerge, en
25 posición horizontal, en otro recipiente que la contiene.

 Como se mencionó más arriba la solución de lisis es seleccionada de tal forma que consiga el desplegamiento de los bucles de cromatina manteniendo mejor la morfología de la cabeza de partida y por lo tanto la formación de los halos
30 característicos con mayor densidad de material cromatínico. Además debe ser lo suficientemente suave para la conservación de las colas de los espermatozoides. Esto se

consigue regulando evitando detergentes agresivos, desnaturalizantes de proteínas. Adicionalmente, la regulación de la concentración iónica también permite modular este proceso.

5 En una variante preferida que esta solución esté compuesta por: cloruro sódico entre 1 y 3 M, preferiblemente entre 2 y 3 M; dithiothreitol (DTT) entre 0.001 y 2M, preferentemente entre 0.01 y 0.8M; 2- amino-2 (hidroxymetyl)-1,3-propanediol (Tris) entre 0.001 y 2M, preferentemente entre 0.01-0.4M; y Triton X-100 entre 0.1 y 3%, preferentemente entre 0.5-1.5%. Esta solución se ajusta a pH entre 6.5 y 8.5,
10 preferentemente 7-7.5.

Existen otras soluciones de lisis alternativas, o bien se pueden variar las concentraciones y tiempos y temperaturas de incubación de la solución descrita siempre que se mantengan sus características funcionales fundamentales. Así, como alternativas
15 al DTT, existen compuestos como el beta-mercaptoetanol y otros agentes reductores. Como alternativas al Tris, se pueden emplear otras soluciones tampón, tales como Hepes, Mops, Pipes. Como alternativa al Triton X-100, se pueden emplear otros detergentes neutros como se ha mencionado más arriba.

20 Según la solución empleada y el tipo de muestra, las preparaciones se incuban en la solución de lisis entre 1 y 60 minutos, preferentemente entre 15 y 35 minutos, especialmente preferido es un tiempo alrededor de 25 minutos; y a una temperatura entre 1 y 37°C, preferentemente 18°C-25°C, especialmente preferida es una temperatura de 20-22°C.

25 Como alternativa global a la secuencia de procesos anteriormente descrita, se puede invertir el orden de incubación en las soluciones desnaturalizantes y de lisis. Los efectos sobre la cromatina de los espermatozoides también permite discriminar los espermatozoides con cromatina/ADN dañado del resto de los espermatozoides. Los
30 detalles de las diferencias obtenidas se describirán en el ejemplo número 6.

Después del tratamiento con solución desnaturalizante de ADN y con solución de lisis, las preparaciones se pueden lavar para eliminar los restos de estas soluciones. Para ello se utiliza una solución de lavado lo más suave posible, evitando agente quelantes o detergentes. Por ejemplo, se sumergen en posición horizontal en un
5 recipiente que contiene abundante agua destilada o una solución tampón o suero fisiológico durante un tiempo entre 1 y 60 minutos.

A continuación se procede a la deshidratación de la muestra. Para ello se puede utilizar soluciones de concentración creciente de alcohol. Por ejemplo, se levantan los
10 portaobjetos y se sumergen en posición horizontal, en recipientes con series de concentración creciente de etanol, entre 5 y 100%, durante 30 segundos a 60 minutos cada una y después las preparaciones se dejan secar al aire. Como alternativas a las incubaciones en series de etanol, las preparaciones se pueden deshidratar incubando en soluciones de diferentes alcoholes como el metanol, o bien dejando secar al aire o en
15 estufa.

Una vez secos, los portaobjetos ya procesados conteniendo la muestra de semen se pueden guardar en cajas archivadoras a temperatura ambiente durante meses. Esto facilita la separación del proceso de tratamiento según la invención y la posterior etapa
20 de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides. El archivado permite una evaluación repetida a diferentes intervalos de varias muestras de un mismo individuo.

Una vez tratadas las muestras según la invención, se pasa a la etapa de
25 evaluación. Hay varios procesos posibles para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides como se ha indicado más arriba. La ventaja es que las muestras tratadas según la invención presentan un halo mucho más claro de visualizar y han mantenido la estructura de los espermatozoides, especialmente la integridad de las colas, lo cual permite distinguir claramente los espermatozoides de
30 otros tipos celulares.

En una variante preferida se procede a una tinción de la muestra que facilita la evaluación visual. Eligiendo convenientemente las condiciones de tinción se puede obtener una alta calidad de las imágenes y una alta consistencia de los resultados de evaluación. Existen varias estrategias para la tinción, según se emplee microscopía
5 convencional de campo claro, o microscopía de fluorescencia.

Tinción para observación en microscopio de campo claro:

En este caso se pueden utilizar colorantes del tipo Wright, Giemsa, Orceína, reactivo de Schiff, Carmín acético, del tipo de las tiazinas y mezclas del tipo
10 Romanowsky o bien derivados de los anteriormente citados (ver Chromosome banding de AT Sumner, pp.90-91).

Se prefieren colorantes como el de Wright por la tinción más intensa de la muestra y en especial de los halos. Con estos colorantes se mejora significativamente el
15 contraste y la discriminación visual de los diferentes tamaños de halos. Además, presentan la ventaja del bajo coste y fácil disponibilidad para todo tipo de laboratorio. Su empleo permite visualizar las colas, pues éstas no suelen ser visibles en tinciones del ADN con fluorocromos empleados para microscopía de fluorescencia. Es importante destacar que esta tinción es muy fácilmente manipulable para conseguir el nivel de
20 tinción adecuado, hecho no factible con Diff-Quik o similares.

Otras tinciones, como el Diff-Quik, descrita en Fernández, J.L. et al. *Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 p.59-66, son considerablemente más débiles y no consiguen un contraste adecuado del halo con respecto al fondo. En consecuencia,
25 cuando el halo está muy disperso, suele ser difícil visualizar su extremo periférico, pudiendo ser considerado como halo pequeño, asignando así la categoría de fragmentado a un espermatozoide que tiene el ADN intacto. Es decir, el procedimiento de la publicación tiene tendencia a sobreestimar los niveles de fragmentación, especialmente en la tinción de campo claro. Esto es relativamente comprometido para
30 un test de posible aplicación a individuos. En consecuencia, es obvio que esta mejora es de enorme relevancia en la fiabilidad de la técnica.

En una variante de la coloración de la muestra se procede a mezclar solución de Wright (Merck 1.01383.0500) con solución tampón fosfato por ejemplo a pH 6.88 (Merck 1.07294.1000) en proporciones entre 1:30 y 30:1 (v/v). Se deposita una capa de colorante, en horizontal, que cubra el microgel seco. El tiempo de tinción para conseguir un contraste óptimo, oscila entre 30 segundos y 60 minutos. Se recomienda soplar sobre la capa de colorante ocasionalmente. Se decanta el exceso de colorante, se lava el portaobjetos suavemente con agua corriente y se deja secar. Si la tinción es excesiva, se puede lavar, con más intensidad, en agua. Otra posibilidad es desteñir en etanol, secar y volver a teñir. Si la tinción es débil, especialmente en la región de los halos de dispersión de la cromatina, se puede volver a teñir directamente con más solución de Wright.

Como alternativas se pueden utilizar otros colorantes tales como Hemacolor 2 (Merck 1.11956) y Hemacolor 3 (Merck 1.11957), Giemsa, así como otras soluciones de tinción de la misma familia.

Tinción para observación en microscopio de fluorescencia:

Dependiendo de la disponibilidad de filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo DAPI, Hoechst 33258, Bromuro de Etidio, Yoduro de Propidio, etc., en un medio “antifading” (por ejemplo Vectashield; Vector H-1000).

En el caso de que se deseen preparaciones permanentes, los portaobjetos procesados y teñidos se pueden incluir en medios de montaje (por ejemplo, Entellan; Merck 1.07961).

Finalmente se procede a la evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides procediendo a la distinción de tipos celulares. Como ya se ha comentado, el procedimiento de la invención facilita enormemente esta evaluación respecto al estado de la técnica.

Las imágenes obtenidas se pueden estudiar mediante análisis visual directo o bien aplicando software de análisis de imágenes digitalizadas, obtenidas mediante cámaras analógicas o bien digitales, acopladas a las plataformas de microscopía.

5

Inicialmente, se recomienda el estudio de un mínimo de 500 espermatozoides por muestra, adoptando los siguientes criterios básicos (ver Figura 1 y Figura 2):

1. Espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina (Figura 1).
- 10 2. Espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina y degradados: aquellos que sin mostrar halo, presentan la cabeza fragmentada en gránulos o muestran una tinción muy débil (Figura 1).
3. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño pequeño: el grosor del halo es igual o menor que $1/3$ del diámetro menor del "core" (Figura 1).
- 15 4. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño mediano: el grosor del halo está comprendido entre: mayor que $1/3$ del diámetro menor del "core" y menor que el diámetro menor del "core" (Figura 1).
- 20 5. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño grande: espermatozoides cuyo halo es igual o mayor que el diámetro menor del "core" (Figura 1).
6. "Otros": núcleos de células que no corresponden a espermatozoides. Una de las características morfológicas que los distinguen es la ausencia de cola.

25

Se consideran espermatozoides con ADN fragmentado aquellos sin halo de dispersión de la cromatina 1, los que se presentan sin halo de dispersión de la cromatina y degradados 2 y aquellos con halo de dispersión de tamaño pequeño 3. Aquellos espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina de tamaño grande y mediano, se considera que no tienen el ADN fragmentado.

30

El criterio para establecer la correlación entre el tamaño de los halos y la fragmentación de ADN deriva de los resultados obtenidos utilizando la técnica de DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization; Fernández et al., 1998; 2000; 2002; Fernández y Gosálvez, 2002). Este procedimiento permite la
5 detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células desproteinizados y sometidos a una desnaturalización controlada del ADN. Esta desnaturalización genera tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura, los cuales son detectados mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN genómico total marcada con un fluorocromo, visible mediante microscopía de
10 fluorescencia. Cuanto mayor es el nivel de roturas en el ADN celular, mayor es la cantidad de ADN de cadena sencilla generada por la solución desnaturalizante, mayor es la cantidad de sonda hibridada y mayor la fluorescencia observada. Las muestras procesadas según la metodología descrita en la presente invención, contienen ADN de cadena sencilla, generado por la solución desnaturalizante, a partir de los posibles
15 extremos de rotura que existen en el ADN. Por lo tanto, la intensidad de la hibridación utilizando una sonda de ADN genómico total, estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el núcleo del espermatozoide. De este modo se ha confirmado que los nucleoides sin halo, o con un halo de tamaño muy reducido, muestran un marcaje intenso con DBD-FISH, lo cual demuestra la intensa fragmentación de su ADN (Figura
20 2). El resto de nucleoides muestran unos niveles muy

bajos de marcado con esta sonda, que se corresponden con el fondo de hibridación generado por el propio tratamiento de la cromatina.

25 La invención también contempla un Kit para la valoración la integridad de la cromatina/ADN de espermatozoides animales. Este Kit contiene una solución desnaturalizante del ADN y una solución de lisis para extraer proteínas nucleares, que se caracteriza porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides. Las soluciones
30 desnaturalizantes de ADN y las soluciones de lisis preferidas están descritas más arriba.

Opcionalmente, el Kit puede contener también el soporte pretratado, por ejemplo con agarosa, así como una solución para la preparación de un medio con características similares a las de una suspensión que contendrá la muestra. Por ejemplo, una solución de agarosa de bajo punto de fusión que permite la preparación de un microgel.

5

A continuación se detalla el contenido y modo de empleo de un Kit según una variante de la invención:

Descripción del contenido del kit

10 Portaobjetos pretratados*

Tubos Eppendorf conteniendo agarosa de bajo punto de fusión tubo (A)

Tubo con HCl 37% , tubo (B)

Tubos con solución de lisis, tubo (C)*. Composición: NaCl 2.5M, DTT 0.2M, Tris 0.2M, Triton X-100 1%, pH 7.5.

15 Recipientes de procesado para la solución desnaturalizante y para solución de lisis
Lanceta

Flotadores para tubos Eppendorf

** Preparación tal y como se refiere más arriba en la descripción*

20

Material y equipo requerido

Microscopio de campo claro o fluorescencia (recomendable objetivo de inmersión)

Nevera a 4°C

Baño de incubación a 37°C

25 Guantes de plástico

Cubreobjetos de cristal (18x18 mm, 22x22 mm o 24x60 mm)

Micropipetas

4 cajas para incubaciones en horizontal

Agua destilada

30 Etanol 70%, 90%, 100%

*Instrucciones de uso**Preparación de una muestra por portaobjetos*

- 1) Tomar un frasco C para poner la solución de lisis a temperatura ambiente (22°C)
- 2) Diluir la muestra de semen en medio de cultivo o PBS, a una concentración de 5-10 millones por mililitro. Se pueden utilizar tanto muestras frescas como congeladas directamente en nitrógeno líquido.

Preparación del microgel de agarosa

- 3) Golpear ligeramente un tubo Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión (Tubo A), en vertical, para depositar la agarosa en el fondo del tubo.
- 4) Añadir 140 microlitros de agua destilada, evitando formar burbujas, y resuspender.
- 5) Introducir el tubo A en el flotador, dejándolo al nivel de la tapa, y dejar flotando 5 minutos en agua a 90-100°C, hasta que la agarosa se disuelva. La fusión de la agarosa se puede realizar alternativamente en un horno microondas.
- 6) Transferir el tubo A con el flotador, a un baño termostático a 37°C, y dejar 5 minutos hasta equilibrar la temperatura.
- 7) Añadir 60 microlitros de la muestra de semen al contenido del tubo A y resuspender.
- 8) Colocar un portaobjetos pretratado en una superficie fría, a 4°C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio).
- 9) Una vez enfriado el portaobjetos, depositar la suspensión celular del tubo A y poner un cubreobjetos de cristal, evitando formar burbujas de aire. Se recomienda depositar una gota de 11, 17 y 50 microlitros, para un cubreobjetos de 18x18mm, 22x22mm, ó 24x60mm, respectivamente.
- 10) Introducir la lámina fría con el portaobjetos, en la nevera y dejar gelificar la muestra durante 5 minutos.

Procesado de las muestras

- 11) Preparar la solución desnaturalizante. Para ello, añadir 80 microlitros del contenido del tubo B en 10 mililitros de agua destilada, mezclar y depositar en la caja verde.

12) Retirar el cubreobjetos, deslizándolo con suavidad, e inmediatamente introducir el portaobjetos, en horizontal, en la solución desnaturalizante y dejar incubando durante 7 minutos, a temperatura ambiente (22 °C).

5 13) Levantar el portaobjetos con ayuda de la lanceta, usando guantes. Sujetarlo en horizontal, y depositarlo en horizontal, en el recipiente blanco conteniendo 10 ml de solución de lisis (tubo C atemperado). Incubar durante 25 minutos.

14) Levantar el portaobjetos e introducirlo en horizontal en una caja conteniendo abundante agua destilada para lavar la solución de lisis. Dejar incubando durante 5 minutos.

10 15) Introducir el portaobjetos, en horizontal, en una caja con etanol 70% (2 minutos), luego en etanol 90% (2 minutos), y finalmente en etanol 100% (2 minutos).

16) Dejar secar al aire. Una vez secos los portaobjetos procesados se pueden guardar en cajas archivadoras, a temperatura ambiente durante meses.

15 *Tinción de las muestras*

Tinción para observación en microscopio de campo claro:

-Mezclar solución de Wright con solución tampón fosfato (1:1), y depositar una capa de colorante, en horizontal, que cubra el microgel seco. Dejar tiñendo durante 5-10 minutos, soplando encima ocasionalmente. Decantar, lavar suavemente con agua corriente y dejar secar. Si la tinción es excesiva, se puede desteñir en etanol, secar y volver a teñir. Si la tinción es débil, especialmente en los halos, se puede volver a teñir directamente con más solución de Wright.

20

-Otra posibilidad es la incubación 5 minutos, en vertical, en un coplin con solución Hemacolor 2 (Merck 1.11956), dejar escurrir en vertical unos 10 segundos e incubar posteriormente en otro coplin, en vertical, con solución Hemacolor 3 (Merck 1.11957), 5 minutos. Finalmente lavar suavemente en agua destilada y dejar secar.

25

Si se desea una preparación permanente, ésta se puede montar en Entellán.

Tinción para observación en microscopio de fluorescencia:

30 Dependiendo de la disponibilidad de filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo DAPI, Hoechst 33258, Bromuro

de Etidio, Yoduro de Propidio, etc., en un medio antifading (por ejemplo Vectashield, Vector, ref: H-1000).

Seguridad y medio ambiente

- 5 Evitar inhalación y contacto con las soluciones suministradas.
Las soluciones B y C contienen Ácido clorhídrico, Dithiothreitol y Triton X-100.
Consultar las especificaciones suministradas por los fabricantes.
No dispensar los productos utilizados al medio ambiente. Ajustarse a la normativa de Centros para el almacenaje y retirada de productos tóxicos.
- 10 Las muestras biológicas deben ser manejadas como potencialmente infecciosas.

Almacenamiento y estabilidad

- Almacenar a temperatura ambiente, excepto la solución C que se deberá almacenar a 4°C. Caducidad: los reactivos y materiales son estables por un periodo mínimo de 6
- 15 meses. Se recomienda que las soluciones B y C se mantengan en posición vertical y bien cerradas.

La presente invención tiene distintos ámbitos dónde es pertinente su aplicación. Es evidente su utilidad en aplicación a humanos. Por ejemplo, en muestras de

20 individuos infértiles cuyos parámetros del seminograma son normales, en parejas con abortos de repetición, en muestras empleadas para reproducción asistida, en muestras que se van a congelar (criopreservación) para su futuro empleo en técnicas de reproducción asistida debido a una posterior extirpación del testículo. También en pacientes sometidos a quimio- y/o radioterapia por patologías oncológicas, y antes de la

25 realización de una vasectomía.

El estudio realizado con el procedimiento y Kit de la invención puede mejorar los criterios de selección de aspirantes a donante de semen, así como complementar la evaluación periódica de las muestras de los donantes, en los bancos de semen. También

30 es posible analizar el efecto de la edad avanzada sobre la calidad del semen y la fertilidad. Es interesante su aplicación para la evaluación de pacientes con patologías

que pueden afectar a la integridad de los espermatozoides: fiebre, infecciones, varicocele, estrés, exposición a agentes genotóxicos de modo laboral o accidental (pesticidas, radiaciones, estrógenos ambientales, etc.), tratamientos hormonales, o exposición reiterada al calor elevado (profesiones en relación con altos hornos, cerámica, vidrio, o conductores de vehículos). Estos individuos también pueden ser evaluados con carácter periódico. Por último, la invención es útil en investigación básica y clínica.

De forma similar la invención también es de utilidad en laboratorios veterinarios. Es posible estudiar el nivel de fragmentación del ADN de los espermatozoides en diferentes especies animales, por ejemplo en machos reproductores, en muestras almacenadas, en procesos patológicos, en machos de especies en peligro de extinción y en la valoración del daño generado por agentes tóxicos.

EJEMPLOS

La invención se describirá ahora sobre la base de unos ejemplos que ilustrarán con más detalle algunas de las características anteriormente descritas.

Ejemplo 1:

En una muestra de semen fresco, se aplicó la metodología descrita para producir los halos de dispersión de la cromatina. Para ello, la muestra diluida a una concentración de 10 millones por mililitro, en PBS, se mezcló con agarosa líquida de bajo punto de fusión al 1%, para obtener una concentración final de esta última, del 0.7%. Tras gelificar el microgel sobre el portaobjetos, la muestra se incubó a 22°C, durante 8 minutos, en la solución desnaturalizante compuesta por HCl 0.08M, y luego en la solución de lisis constituida por NaCl 2.5M, DTT 0.2M, Tris 0.2M, Triton X-100 1%, pH 7.5, durante 25 minutos, a 22°C. Los portaobjetos se lavaron en agua destilada durante 5 minutos, se deshidrataron en baños de etanol, y se secaron al aire. Posteriormente, de forma secuencial y sobre las mismas células, se procedió a efectuar el DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization;

Fernández et al., 1998; 2000; 2002; Fernández y Gosálvez, 2002) utilizando una sonda de ADN genómico total. Este procedimiento permite la detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células inmersas en microgeles de agarosa, desproteinizados y sometidos a una desnaturalización controlada del ADN. Esta
5 desnaturalización genera tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura, los cuales son detectados mediante hibridación in situ utilizando una sonda de ADN genómico total marcada con un fluorocromo que emite fluorescencia roja (Cy3). Cuanto mayor es el nivel de roturas en el ADN celular, mayor es la cantidad de ADN de cadena sencilla generada por la solución desnaturalizante, mayor es la cantidad de sonda
10 hibridada y mayor la fluorescencia roja obtenida. Las muestras procesadas según el procedimiento de la presente invención contienen ADN de cadena sencilla, generado por la solución desnaturalizante, a partir de los posibles extremos de rotura que existen en el ADN. Por lo tanto, la intensidad de la hibridación utilizando una sonda de ADN genómico total, estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el núcleo del
15 espermatozoide.

Se contabilizaron 250 células obtenidas al azar. Las imágenes de tinción mediante DAPI, de los halos de dispersión de la cromatina, se capturaron utilizando una cámara CCD refrigerada utilizando dos filtros para la visualización simultánea de los halos de dispersión, visibles en azul, y de la señal de hibridación, visible en rojo. El fin
20 último era establecer una correlación entre el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina y el nivel de marcado de las roturas de ADN. Los resultados demostraron una correlación inversa entre el área relativa de los halos de dispersión de la cromatina y la intensidad de marcado de las roturas del ADN mediante DBD-FISH (Tabla 1).

5

10

15

20

25

30

Tabla 1

Nótese

relativa

un

densidad

la

HALO GRANDE	Area halo/total	DMtotal
Media	0.85	13.07
Desviación estándar	0.05	7.35
Cuenta	154	154
HALO MEDIANO	Area halo/total	DMtotal
Media	0.73	24.85
Desviación estándar	0.07	12.52
Cuenta	38	38
HALO PEQUEÑO	Area halo/total	DMtotal
Media	0.48	180.28
Desviación estándar	0.14	117.82
Cuenta	22	22
SIN HALO	Area halo/total	DMtotal
Media	-	407.34
Desviación estándar	-	252.69
Cuenta	29	29
DEGRADADAS	Area halo/total	DMtotal
Media	-	101
Desviación estándar	-	86
Cuenta	7	7

que a medida que disminuye el área del halo, se produce incremento en la media (DM) total de hibridación.

En consecuencia, la simple determinación del tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, obtenidos mediante nuestro procedimiento, ofrecen una estimación simple y directa de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides humanos.

5 Ejemplo 2:

Método complementario para la evaluación del semen de donantes empleado en las técnicas de reproducción asistida.

En una clínica de reproducción asistida, se tomaron 10 muestras de donantes de semen. Como complemento del espermiograma habitual, se procedió a la determinación del nivel de fragmentación de ADN en dichas muestras. Se contabilizaron 500 células por individuo. En este caso, los resultados se obtuvieron aplicando el test de halos de dispersión de la cromatina de la invención. Las muestras se incluyeron en el microgel de agarosa, se incubaron en la soluciones ácida y de lisis, se lavaron, se deshidrataron y se dejaron secar, conforme a lo descrito en el ejemplo 1. La tinción, en este caso, no se practicó con el DAPI sino con el colorante de Wright, para microscopía de campo claro. Para ello se mezcló la solución de Wright con solución tampón fosfato (1:1), y se depositó una capa de colorante, en horizontal, cubriendo el microgel seco. Se tiñó durante 5-10 minutos, soplando encima ocasionalmente. Tras un lavado en agua corriente, se dejó secar y se visualizaron los nucleoides. Los resultados se muestran en la tabla 2. El nivel de fragmentación medio estimado en este grupo fue menor del 20% en todos los casos (15.4 +/- 3.1).

5

10

n ^o muestr a	% Células Halo grande	% Células mediano	% Células pequeño	% Células sin halo	% Células degradadas	% Células fragmentad as
n1	76.2	7.4	10.2	5.0	1.2	16.4
n2	74.4	7.0	11.2	7.4	-	18.6
n3	72.6	16.4	6.2	4.8	-	11.0
n4	78.6	6.0	7.4	6.6	1.4	15.4
n5	81.6	5.8	7.0	5.4	0.2	12.6
n6	69.4	11.0	12.6	6.0	1.0	19.6
n7	73.2	7.2	9.6	8.8	1.2	19.6
n8	80.2	5.4	8.4	5.0	1.0	14.4
n9	85.2	2.6	5.0	6.8	0.4	12.2
n10	79.8	5.6	6.8	7.0	0.8	14.6

Tabla 2

Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de halo obtenidos en 10 individuos donantes de semen. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

20 Ejemplo 3:

Evaluación clínica de pacientes infértiles.

En una clínica de reproducción asistida, se tomaron 17 muestras de donantes de semen. Como complemento del espermiograma habitual, se procedió a la determinación del nivel de fragmentación de ADN en dichas muestras. Se contabilizaron 500 células por individuo. Al igual que en el ejemplo anterior, los resultados se obtuvieron aplicando el test de halos de dispersión de la cromatina de la invención. Los resultados se muestran en la tabla 3. El nivel de fragmentación medio estimado en este grupo fue mayor del 20% en todos los casos (49.9 +/- 20.7). En algunos pacientes se han obtenido niveles cercanos al 90% de espermatozoides con fragmentación en su ADN.

Nº Muestra	% Células Halo grande	% Células Halo mediano	% Células Halo pequeño	% Células sin Halo	% Células degradadas	% Células fragmentadas
p1	47.0	12.0	16.2	22.4	2.4	41.0
p2	38.4	3.2	15.2	42.2	1.0	58.4
p3	39.6	1.6	13.2	44.6	1.0	58.8
p4	53.4	10.6	11.0	17.6	7.4	36.0
p5	42.4	5.2	15.2	35.8	1.4	52.4
p6	50.0	5.8	10.0	32.9	1.2	44.2
p7	39.0	11.2	22.6	21.2	6.0	49.8
p8	60.6	4.8	9.4	22.8	2.4	34.6
p9	69.4	3.2	7.4	19.0	1.0	27.4
p10	60.6	4.4	10.4	24.0	0.6	35.0
p11	11.3	3.0	6.0	75.8	4.0	85.8
p12	65.6	4.2	2.4	24.4	3.4	30.2
p13	16.7	11.9	24.3	46.8	0.3	71.4
p14	8.4	4.4	18.6	67.0	1.6	87.2
p15	64.7	8.2	11.2	13.7	2.2	27.1
p16	14.6	5.0	10.6	63.4	6.4	80.4
p17	65.8	5.8	9.4	17.4	1.6	28.4

5

10

15

Tabla 3

Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de halo obtenidos en 17 pacientes. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la

suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

Ejemplo 4:

5 Empleo de la invención para la evaluación del daño toxicológico que afecta a espermatozoides humanos. Daño por agentes exógenos y endógenos.

Como ejemplo ilustrativo se presenta un estudio analizando el daño del ADN inducido por un agente químico donante de óxido nítrico (NO). Para ello, alícuotas de 50 microlitros de una muestra de semen total fresco de un individuo normal, se incubaron
10 durante 1 hora, a temperatura ambiente, con diferentes dosis de nitroprusiato sódico (SNP). Posteriormente, las muestras tratadas se centrifugaron suavemente eliminando el sobrenadante, para lavar el SNP. Tras resuspender en PBS, las muestras se procesaron según el método descrito en la presente invención.

15

Los resultados se presentan en la tabla 4. Se observó que a medida que se incrementaba la concentración del donante de NO, se incrementaba el porcentaje de espermatozoides con cromatina/ADN dañado.

Concentración de SNP (microM)	% Células Halo grande	% Células Halo mediano	% Células Halo pequeño	% Células sin Halo	% Células degradadas	% Células fragmentadas
0.0	61.8	14.1	12.0	12.1	0.0	24.1
62.5	38.0	23.2	19.6	19.2	0.0	38.8
125	21.8	24.2	32.6	23.1	0.0	55.7
250	14.9	19.0	40.3	30.1	0.0	70.4
500	3.8	22.5	39.6	34.1	0.0	73.7

20

25

Tabla 4

Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de halo obtenidos en una muestra de semen tratada con diferentes concentraciones de un agente donante de óxido nítrico (SNP), con capacidad de producir daño en el ADN. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

Ejemplo 5:

Reproducibilidad del ensayo utilizando muestras de semen congelado.

Se estudiaron dos factores que podrían afectar a la calidad de las muestras, como son la congelación y la dilución, mediante la metodología de análisis del grado de dispersión de los halos de cromatina. Para ello se analizaron 4 muestras de diferentes donantes en fresco y se congelaron alícuotas en nitrógeno líquido. El análisis de las muestras se realizó mediante el recuento visual directo de los distintos tipos de nucleoides (500 células), en dos portaobjetos diferentes y un mínimo de dos veces, por muestra y punto experimental.

Reproducibilidad de los conteos. Se calculó el coeficiente de correlación intraclass (R) para las diferentes mediciones que se realizaron sobre cada portaobjetos. Los resultados de los índices para cada tipo celular y calculados con el promedio de dos conteos oscilan entre valores de 0.78 y 0.92, y teniendo en cuenta que los valores de R varían entre 0 y 1, se demuestra que se obtiene una elevada reproducibilidad (Tabla 5).

5	10	Tabla		Media	Intervalo de confianza 95%
			Diferencia % células halo grande	-0.78	(-1.98; 0.42)
			Diferencia % células halo mediano	0.56	(-0.17;1.29)
			Diferencia % células halo pequeño	0.36	(-0.48;1.20)
			Diferencia % células sin halo	-0.19	(-0.88;0.50)
10	10	Tabla	Diferencia % células sin halo degradadas	0.04	(-0.35;0.43)
			Diferencia % células con ADN fragmentado	0.21	(-0.67;1.09)

5

15 Congelación. Los resultados obtenidos se contrastaron utilizando un análisis de
varianza de dos factores (método de conservación y muestra). Se demostró que no
existen diferencias significativas ($p>0.05$) en el nivel de fragmentación de muestras
procesadas en fresco y congeladas en nitrógeno líquido. El tiempo de congelación
tampoco parece afectar a la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado
20 (Tabla 6).

5

10

Tabla

Muestra	Estado de la muestra	Media	Desviación típica
1	E. Fresco	19.58	0.22
	E. Congelado	20.20	1.48
2	E. Fresco	13.38	1.87
	E. Congelado	13.39	1.86
3	E. Fresco	12.75	3.04
	E. Congelado	11.53	1.92
4	E. Fresco	22.13	0.74
	E. Congelado	21.56	2.68

6

En conclusión, se pone de manifiesto la reproducibilidad de los resultados obtenidos tras el análisis visual directo.

Ejemplo 6:

Análisis de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoide humanos utilizando la variante en el orden de incubación en las soluciones de desnaturalización y de lisis.

En esta variante, tras incluir los espermatozoides en los microgeles de agarosa, se incuban, en una primera etapa, en la solución de lisis descrita en el Kit, durante 25 minutos, a 22°C. Posteriormente, los portaobjetos se sumergen en la solución desnaturalizante compuesta por HCl 0.08M, durante 8 minutos, a 22°C. Finalmente, tras el lavado en agua destilada, los portaobjetos son deshidratados y teñidos con la solución de Wright, siendo observados mediante microscopía de campo claro.

Utilizando esta variante técnica, los espermatozoides con ADN fragmentado se comportan de modo diferente. En este caso, dispersan fragmentos de cromatina/ADN, dando lugar a halos de mayor tamaño.

Ejemplo 7:

Resultados de la aplicación de la metodología sobre muestras de esperma de distintos animales.

5

Con objeto de evaluar el carácter universal de la metodología que se propone, se seleccionaron individuos macho de distintas especies para realizar un estudio de los niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides y la visualización paralela de su cola como elemento celular distintivo. Se tomaron muestras de espermatozoides de las siguientes especies: ratón (*Mus musculus*), toro (*Bos taurus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lombriz de tierra (*Lombricus terrestris*). En todas las especies, la aplicación de la técnica genera halos de dispersión de la cromatina en los espermatozoides y puede reconocerse la cola de los mismos, tanto de los que tienen su ADN normal como de aquellos que lo presentan fragmentado (Figura 4). La forma de los espermatozoides y el tipo de halo que genera, es característica de cada especie (4a corresponde a toro; 4b,c,d corresponde a ratón; 4e corresponde a la lombriz de tierra; 4f corresponde al rodaballo). La morfología del espermatozoide, tanto el que contiene ADN fragmentado como el que no, es distinta entre las especies y distinta a su vez a la encontrada en humanos. En todos los casos, la dispersión de la cromatina es paralela y equiparable a lo encontrado en el caso de muestras de esperma humano. Es decir, se producen halos de dispersión de la cromatina de distinto tamaño y se puede visualizar la cola del espermatozoide.

Se estudió la morfología y tamaño de los halos en las distintas especies y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

En el caso del toro se analizaron cuatro muestras independientes utilizando 5 observadores distintos. En este caso, se encontraron diferencias en lo que se refiere al porcentaje de núcleos espermáticos con ADN fragmentado por cada individuo, pero no se observaron diferencias entre porcentajes obtenidos por cada observador (Tabla 7)

PAGE LEFT INTENTIONALLY BLANK

TOTAL	% GRANDE	% MEDIANO	% PEQUEÑO	% SIN HALO	% DEGRADADAS	% FRAGMENTADAS
Ob1-500	75.8	9.8	7.2	7.2	0	14.4
Ob2-500	77	7.2	12	3.6	0.2	15.8
Ob3-500	77	8	9.8	5	0.2	15
Ob4-500	72.8	11.4	8.8	7	0	15.8
Ob5-500	73	11.2	8.2	7.6	0	15.8
500	75.1	9.4	9.1	5.9	0.1	15.3
Ob1-500	80.6	10	6.2	3.2	0	9.4
Ob3-500	82.2	8	6	3.8	0	9.8
Ob4-500	82.4	8.4	6.2	3	0	9.2
500	81.7	8.8	6.1	3.3	-	9.5
Ob1-500	71.2	6.2	10.8	11.4	0.4	22.6
Ob2-500	70.8	4.6	14	10.6	0	24.6
Ob3-500	75	5.6	12	7.2	0.2	19.4
Ob5-500	72.2	6.8	14.2	6.4	0.4	21
500	72.3	5.7	12.7	8.6	0.3	21.8
Ob2-500	85.2	8.4	3.8	2.6	0	6.4
Ob3-500	84.4	10	3.2	2.4	0	5.6
Ob4-500	80.8	12.8	4	2.4	0	6.4
500	83.4	10.2	3.7	2.5	0	6.1

Tabla 7

- 5 En el caso del ratón, se utilizaron dos cepas diferentes una normal (M1-32NNC y otra consanguínea (M2-32BC). Los porcentajes obtenidos para los diferentes tipos de halo muestra claras diferencias entre una cepa normal (7.1) y la consanguínea (25.1) (Tabla 8).

10

TOTAL	% GRANDE	% MEDIANO	% PEQUEÑO	% SIN HALO	% DEGRADADAS	% FRAGMENTADAS
M2-32BC	63	11.5	18.1	6.9	0.1	25.1
M1-32NNC	86.2	6.5	4.6	2.5	0.2	7.1

Tabla 8

15 En el caso específico del rodaballo, se podían distinguir espermatozoides que presentaban un halo de dispersión de la cromatina grande y un "core" pequeño, frente a aquellos que presentaban un halo de dispersión pequeño frente a un "core" grande y
20 finalmente otros sin halo de dispersión. Los resultados se recogen en la tabla 9.

5

10

15

Tabla

% Halo Grande/ Core Pequeño	% Halo Pequeño/ Core Grande	% Sin Halo Solo Cabeza
94	5.6	0.4
92.8	7	0.2
95.6	4	0.4
94.1	5.4	0.3
72.2	25.2	2.6
71.6	25.4	3
77	20.2	2.8
73.6	23.5	2.8
75.2	18.4	6.4
71.2	22	6.8
78	15	7
74.7	18.2	6.7

9

20

En el caso de la lombriz de tierra se produce una dinámica de generación de halos parecida a la descrita en los casos anteriores y en este caso también se puede distinguir perfectamente la cabeza del espermatozoide y su cola. El porcentaje estimado de espermatozoides que contienen ADN fragmentado en 2 individuos estudiados (uno joven y uno maduro) fue de un 15% y un 22 %, respectivamente. En este caso, aparecen cabezas de espermatozoides con una formación parcial de halos, cuyo significado se encuentra actualmente en fase de investigación (ver Figura 4 e).

Ejemplo 8:

Visualización sobre la misma preparación citológica de halos de dispersión de la cromatina, cola del espermatozoide y leucocitos. Evaluación del efecto de la leucocitospermia sobre la integridad del ADN en muestras de esperma.

5 La leucocitospermia es un proceso invasivo no deseado que se refiere al incremento anormal de leucocitos en muestras de fluido seminal ($> 5 \times 10^6/\text{ml}$). Se ha detectado que entre un 10 y un 20 % de hombres infértiles presentan leucocitospermia. Parece ser que tanto los neutrófilos como los macrófagos presentes en el semen, pueden generar ROS (Reactive Oxygen Species) que facilitarían el estrés oxidativo y como
10 consecuencia el daño en el ADN de los espermatozoides (Omu et al., 1999; Erenpreiss et al., 2002; Henkes et al., 2003). De hecho, la leucocitospermia se ha asociado con distintas anomalías de los parámetros clásicos utilizados en el análisis de la calidad del esperma. Por ejemplo, mientras que la incidencia de espermatozoides anormales concurre en tan sólo el 47% de las muestras de individuos sin leucocitospermia, el
15 porcentaje aumenta a un 88% cuando concurre esta circunstancia (www.clevelandclinic.org).

En una muestra de 5 pacientes, con presencia de altos niveles de leucocitospermia de diferente etiología (prostatitis e infecciones por Clamidomonas y
20 agentes bacterianos), se estudió la respuesta de la técnica para diferenciar, de forma inequívoca, el porcentaje de leucocitos presentes en la muestra de semen y los niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides de esas mismas muestras. La diferencia entre ambos tipos celulares, cuando la muestra se somete al mismo tratamiento, es obvia dado que tanto los espermatozoides con ADN fragmentado como
25 los que no lo presentan, muestran la cola que los caracteriza. La ausencia de cola en los leucocitos, nos permite diferenciarlos del resto de los tipos celulares (Figura 5).

De esta forma se puede establecer una correlación directa entre número de leucocitos por muestra y niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides. La
30 tabla 10 muestra el nivel de leucocitos en muestras de semen en 5 pacientes afectados por leucocitospermia de diferente etiología y los porcentajes de espermatozoides con

ADN normal (halo grande y mediano G/M) y fragmentado (halo pequeño y sin halo P/SH).

5

	% Leucocitos	% Células halo (G/M) %	% Células halo (P/SH)
Muestra 1	6.1	73.9	20
Muestra 2	15.5	55.3	29.2
Muestra 3	17	48.2	34.8
Muestra 4	22	31.7	46.3
Muestra 5	25.6	30.5	43.9

10

Tabla 10

REFERENCIAS

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 59:1037-1046.

De Jonge C (2002) The clinical value of sperm nuclear DNA assessment Hum. Fertil. 5:51-53.

20

Erenpreiss J , Hlevicka S, Zalkalns J and Erenpreisa JJ (2002) Effect of Leukocytospermia on Sperm DNA Integrity: A Negative Effect in Abnormal Semen Samples. Journal of Andrology 23: 5.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed, MR (1980) Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility. Science. 210:1131-1133.

Evenson DP and Jost, LK (1994) Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, eds. Methods in Cell Biology. Vol 42. Flow Cytometry. 2nd ed. Orlando, Fla: Academic Press; 42:159-176.

30

Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R (2000) Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J. Androl.* 21: 739-746.

- 5 **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP** (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14:1039-1049.

- 10 **Evenson DP, Larson KJ, Jost LK** (2002) Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23:25-43.

- 15 **Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J** (1998) Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:251-256.

- 20 **Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J** (2000) DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.* 453:77-82.

- 25 **Fernández JL, Gosálvez J** (2002) Application of FISH to detect DNA damage: DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol. Biol.* 203:203-216.

Fernández JL, Goyanes V, Gosálvez J (2002) DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). In: Rautenstrauss B, Liehr T, eds. *FISH technology-Springer lab manual*. Heidelberg: Springer-Verlag; 282-290.

- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG** (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24: 59-66.
- Henkel R, Maass G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, Villegas J, Sanchez R, Kruger TF, Schill WB.** (2003) Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia.* 35:309-13.
- Larson KL, DeJonge C, Barnes A, Jost L, and Evenson DP** (2000) Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Hum. Reprod.* 15:1717-1722.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z** (1993) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:945-951.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W** (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 2:613-619.
- Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, Fatinikun MT, Fernandes S.** (1999) Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 86:195-202 (1999)
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP** (1995) Mammalian sperm DNA susceptibility to in-situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 16:80-87.
- Sumner AT** (1990) Chromosome banding. Unwin Hyman, London.
- World Health Organization** (1999) WHO laboratory manual for the examination of the human semen and semen-cervical mucus interaction. Cuarta Edición, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal que comprende:
 - 5 a) una etapa de tratamiento de la muestra conteniendo los espermatozoides, con una solución desnaturalizante del ADN,
 - b) una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,
 - 10 c) una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides, caracterizado porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides.
2. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizado porque la etapa a) precede a la b), o sólo se procede a la b) y c).
3. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la solución de lisis comprende un detergente no iónico no desnaturalizante de proteínas.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-3 caracterizado porque el detergente no iónico es un detergente seleccionado del grupo toctylfenoxipolietoxietanol (Triton-X100), N,N-Bis(3-D-gluconamidopropil) cholanida (BigCHAP), Brij(r) 35 P, N-decanoil-N-metilglucamina, digitonin, dodecanoyl-N-metilglucamida, heptanoil-N-metilglucamida, octilfenoxi poly(etileneoxi)etanol
25 ramificado (Igepal CA-630), N-Nonanoil-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-Octanoil-N-metilglucamine, solución Span 20, polisorbato 20 (Tween 20) y sus mezclas, preferentemente Triton-X 100.
5. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-4 caracterizado porque la
30 solución de lisis comprende cloruro sódico entre 1 y 3 M, dithiothreitol (DTT) entre

0.001 y 2M, 2- amino-2 (hidroxymetyl)-1,3-propanediol (Tris) 0.001 y 2M y Triton X-100 entre 0.1 y 3%.

6. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-5 caracterizado porque la solución de lisis comprende cloruro sódico alrededor de 2,5M, DTT alrededor de 0.2M, Tris alrededor de 0.2M, Triton-X alrededor de 1% y pH alrededor de 7.5.

7. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-6 caracterizado porque la solución desnaturalizante del ADN es ácida.

8. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7 caracterizado porque la solución desnaturalizante del ADN comprende un ácido seleccionado del grupo ácido clorhídrico, acético, nítrico o mezclas de éstos.

9. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 8 caracterizado porque la solución desnaturalizante del ADN comprende ácido clorhídrico.

10. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-9 caracterizado porque después de las etapas a) y b) hay una etapa de tinción de la muestra.

11. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 10 caracterizado porque la tinción se hace con una solución tipo Wright.

12. Un procedimiento de acuerdo a las reivindicaciones 1-11 caracterizado porque la muestra conteniendo los espermatozoides se incluye en un medio similar a una suspensión, preferentemente en un microgel.

13. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 12 caracterizado porque la muestra conteniendo los espermatozoides se incluye en un microgel de agarosa.

14. Un Kit para la evaluación de la calidad de los espermatozoides de animales que comprende:

- a) una solución desnaturalizante del ADN,
- b) una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,

5

caracterizado porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides.

15. Un Kit de acuerdo a la reivindicación 14 caracterizado porque la solución de lisis comprende cloruro sódico entre 1 y 3 M, dithiothreitol (DTT) entre 0.001 y 2M, 2-amino-2 (hidroxymetyl)-1,3-propanediol (Tris) 0.001 y 2M y Triton X-100 entre 0.1 y 3%.

15

20

25

30

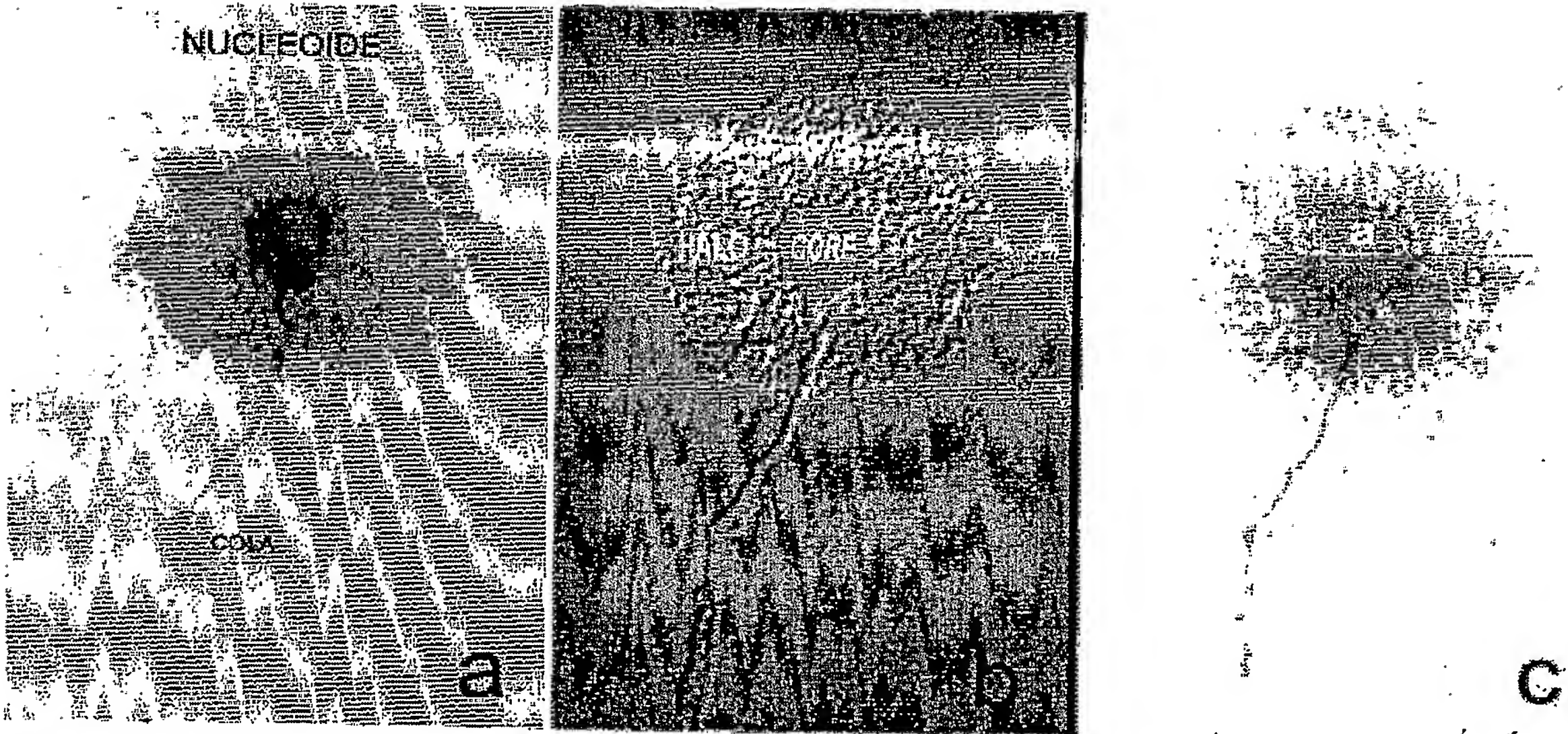


Fig 1.

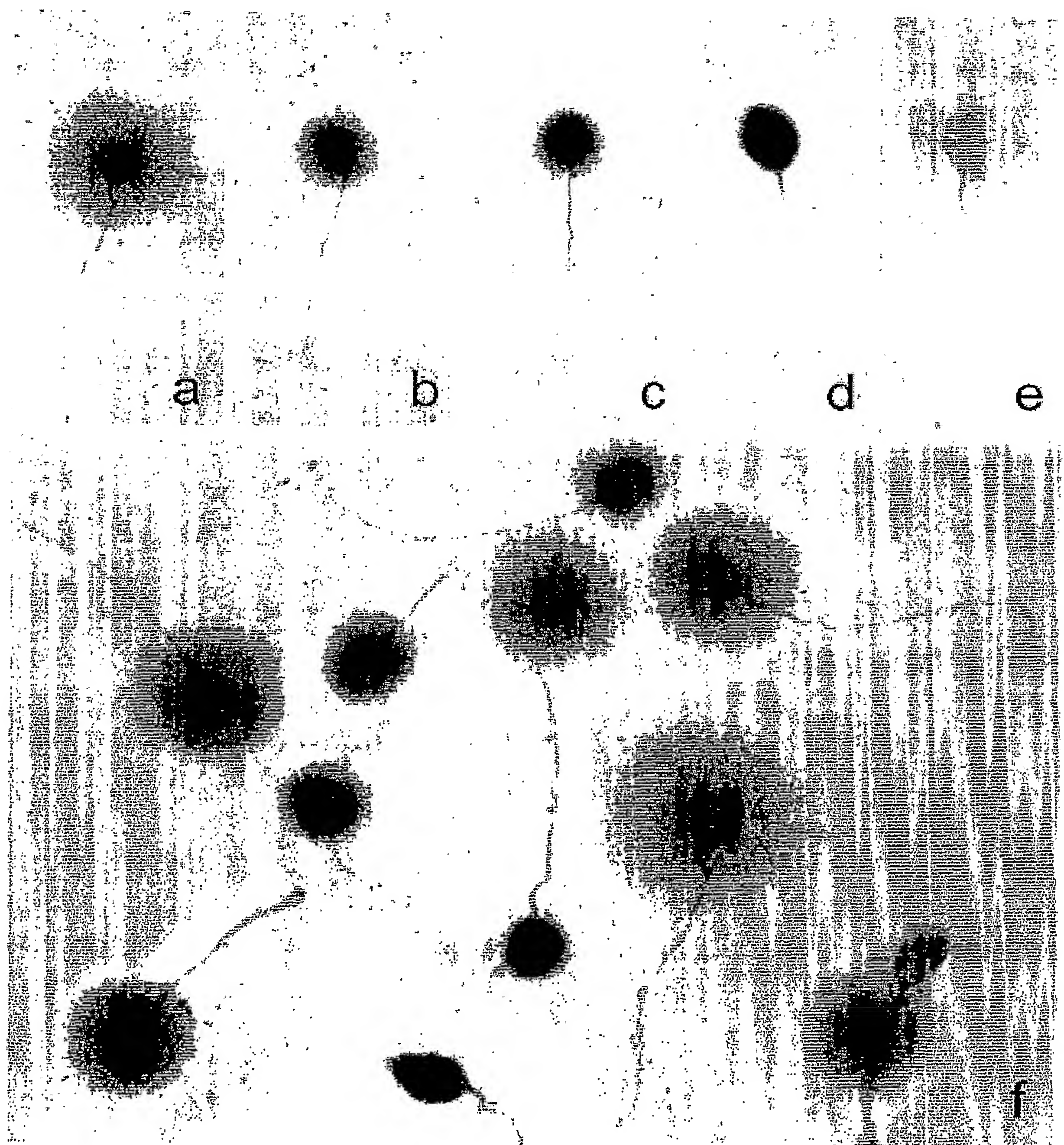


Fig 2.

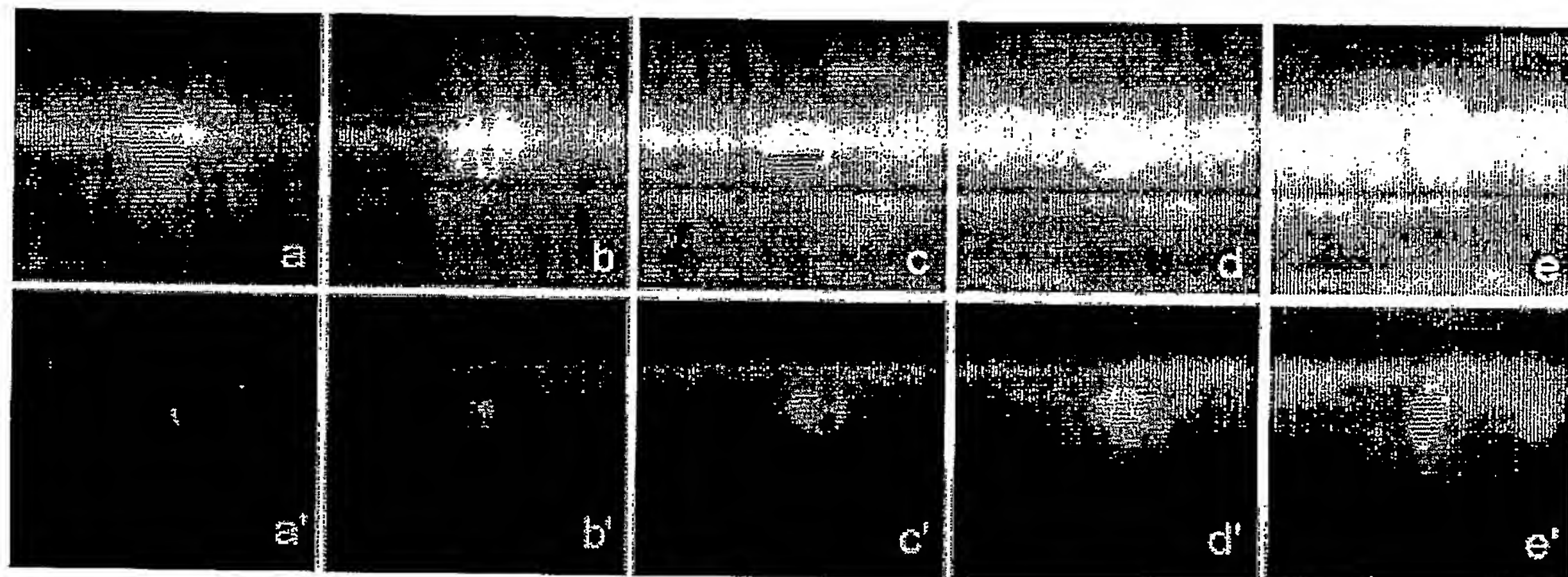


Fig 3.

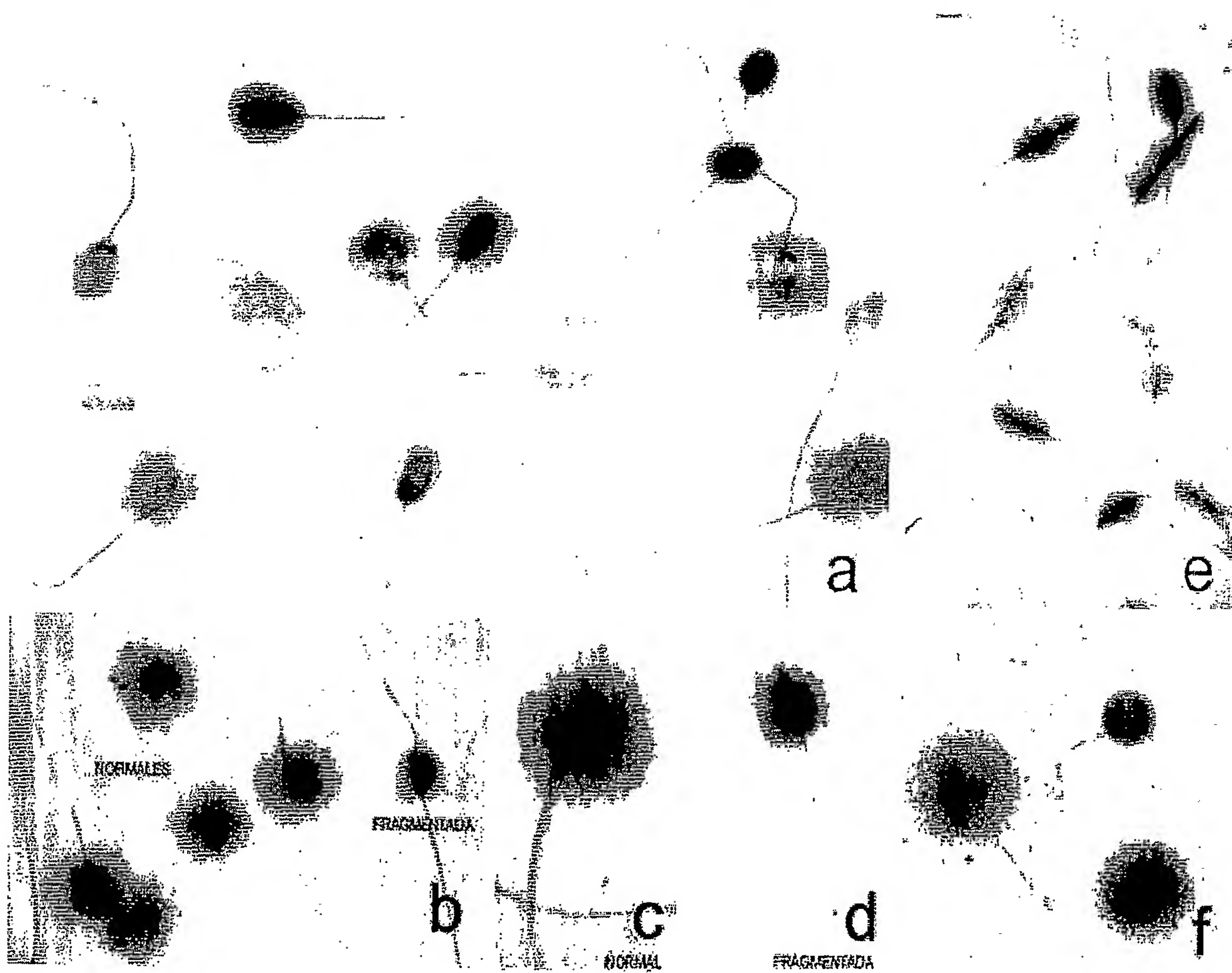


Fig. 4

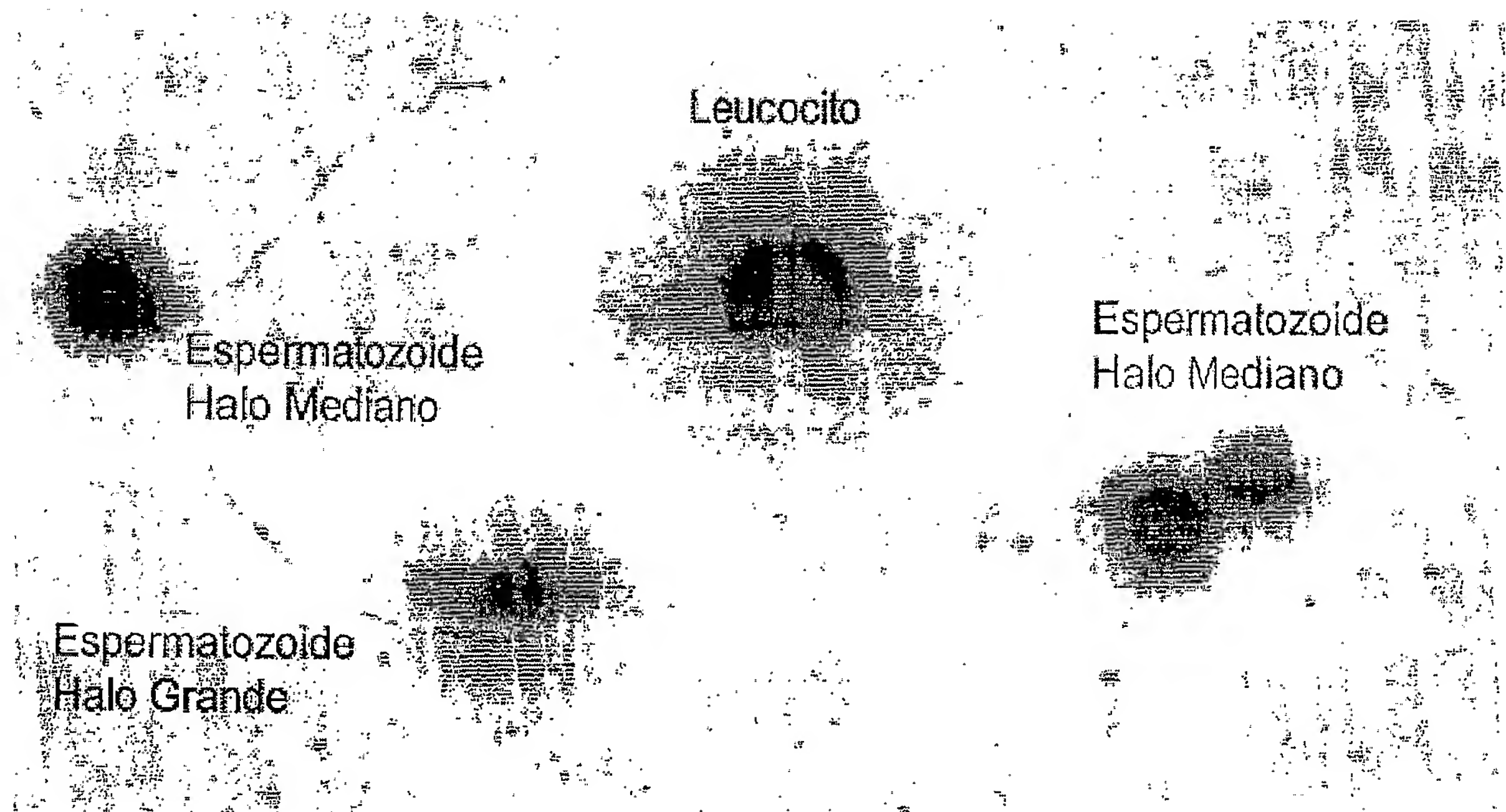


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ☐ National Application No
PCT/IB2005/000187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERNÁNDEZ JOSE LUIS ET AL: "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." JOURNAL OF ANDROLOGY. 2003 JAN-FEB, vol. 24, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 59-66, XP008052005 ISSN: 0196-3635 cited in the application	1,2,7-14
Y	the whole document	3-6,15
X	US 5 801 058 A (BLANCO-ESTEVE ET AL) 1 September 1998 (1998-09-01)	1-9,14, 15
Y	the whole document	11-13
----- -/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 2005

Date of mailing of the international search report

19/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Botz, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In :ional Application No
PCT/IB2005/000187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANKEM MURALI K ET AL: "Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: Implications for male factor infertility" UROLOGY, vol. 59, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 575-578, XP002343631 ISSN: 0090-4295	1,2,7-14
Y	the whole document	3-6,15
X	MARTINEZ-PASTOR F ET AL: "Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen" ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, vol. 84, no. 1-2, August 2004 (2004-08), pages 121-133, XP002343632 ISSN: 0378-4320 cited in the application page 124, paragraph 2.5	1-10,14, 15
X	FERNANDEZ J L ET AL: "DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: Technical variants evidence different structural features" MUTATION RESEARCH, vol. 453, no. 1, 20 September 2000 (2000-09-20), pages 77-82, XP008052017 ISSN: 0027-5107 cited in the application	1-6,10, 14,15
Y	the whole document	11-13
X	MURIEL LOURDES ET AL: "Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. MAR 2004, vol. 10, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 203-209, XP008052031 ISSN: 1360-9947	1-6,10, 14,15
Y	the whole document	11-13
X	SZCZYGIEL MONIKA A ET AL: "Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage." BIOLOGY OF REPRODUCTION. NOV 2002, vol. 67, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 1532-1537, XP002343633 ISSN: 0006-3363	14,15
Y	the whole document	3-6

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/IB2005/000187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LABETA M O ET AL: "SOLUBILIZATION EFFECT OF NONIDET P-40 TRITON X-100 AND CHAPS IN THE DETECTION OF MHC-LIKE GLYCOPROTEINS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 112, no. 1, 1988, pages 133-138, XP002343634 ISSN: 0022-1759 the whole document</p>	3-6,15
Y	<p>SOTOLONGO BARBARA ET AL: "Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA." BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 69, no. 6, December 2003 (2003-12), pages 2029-2035, XP002343635 ISSN: 0006-3363 the whole document</p>	3-6,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

formation on patent family members

In **Original Application No**
FCI/IB2005/000187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5801058	A	01-09-1998	FR 2721405 A1	22-12-1995

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2005/000187

<p>A. CLASIFICACION DE LA INVENCION</p> <p>IPC 7 C12Q1/68</p> <p>Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC</p>																	
<p>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA</p> <p>Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)</p> <p>IPC 7 C12Q</p> <p>Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda</p> <p>Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)</p>																	
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoría*</th> <th>Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes</th> <th>N° de las reivindicaciones pertinentes</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>FERNANDEZ JOSE LUIS ET AL: "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." JOURNAL OF ANDROLOGY. 2003 JAN-FEB, vol. 24, no. 1, Janu'ary 2003 (2003-01), pages 59-66, XP008052005 ISSN: 0196-3635 cited in the application</td> <td>1,2,7-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Todo el documento</td> <td>3-6, 15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5801058 A (BLANCO-ESTEVE ET AL) 1 de septiembre 1998 (1998-09-01)</td> <td>1-9, 14, 15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Todo el documento -/--</td> <td>11-13</td> </tr> </tbody> </table>			Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes	X	FERNANDEZ JOSE LUIS ET AL: "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." JOURNAL OF ANDROLOGY. 2003 JAN-FEB, vol. 24, no. 1, Janu'ary 2003 (2003-01), pages 59-66, XP008052005 ISSN: 0196-3635 cited in the application	1,2,7-14	Y	Todo el documento	3-6, 15	X	US 5801058 A (BLANCO-ESTEVE ET AL) 1 de septiembre 1998 (1998-09-01)	1-9, 14, 15	Y	Todo el documento -/--	11-13
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes															
X	FERNANDEZ JOSE LUIS ET AL: "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." JOURNAL OF ANDROLOGY. 2003 JAN-FEB, vol. 24, no. 1, Janu'ary 2003 (2003-01), pages 59-66, XP008052005 ISSN: 0196-3635 cited in the application	1,2,7-14															
Y	Todo el documento	3-6, 15															
X	US 5801058 A (BLANCO-ESTEVE ET AL) 1 de septiembre 1998 (1998-09-01)	1-9, 14, 15															
Y	Todo el documento -/--	11-13															
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.		<input checked="" type="checkbox"/> Véase el Anexo de la familia de patentes.															
<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</p>		<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente</p> <p>"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes</p>															
<p>Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional</p> <p>6 de septiembre</p>		<p>Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional</p> <p>19/09/2005</p>															
<p>Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional</p>		<p>Funcionario autorizado</p>															
<p>Facsímil N°</p>		<p>Teléfono N°</p>															

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2005/000187

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	<p>ANKEM MURALI K ET AL : "Novel assay for determi ni ng DNA organization in human spermatozoa : Implications for male factor nfertility"</p> <p>UROLOGY,</p> <p>vol . 59 , no . 4 , April 2002 (2002-04) ,</p> <p>Paginas 575-578 , XP002343631</p> <p>ISSN : 0090-4295</p>	1 , 2 , 7-14
Y	<p>Todo el documento</p> <p>— — — — —</p>	3-6 , 15
X	<p>MARTINEZ-PASTOR F ET AL : "Use of chromati n stability assay, mitochondrial stain JC-I , and fluorometri cassessment of plasma membrane to eval uate frozen-thawed ram semen "</p> <p>ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE ,</p> <p>vol . 84, no . 1-2 , Agosto 2004 (2004-08) ,</p> <p>Paginas 121-133 , XP002343632</p> <p>ISSN : 0378-4320</p> <p>Citada en la solicitud</p> <p>Paginas 124 , paragrafo 2.5</p> <p>— — — — —</p>	1-10 , 14 , 15
X	<p>FERNANDEZ J L ET AL : "DNA breakage detecti on-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa : Technical variants evidence different structural features "</p> <p>MUTATION RESEARCH ,</p> <p>vol . 453 , no . 1 ,</p> <p>20 Septiembre 2000 (2000-09-20) , paginas 77-82 , XP008052017</p> <p>ISSN : 0027-5107</p> <p>Citada en la solicitud</p>	1-6 , 10 , 14 , 15
Y	<p>Todo el documento</p> <p>— — — — —</p>	11-13
X	<p>MURIEL LOURDES ET AL : "Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysi s . "</p> <p>MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION . MAR 2004,</p> <p>vol . 10 , no . 3 , marzo 2004 (2004-03) ,</p> <p>Paginas 203-209 , XP008052031</p> <p>ISSN : 1360-9947</p>	1-6 , 10 , 14 , 15
Y	<p>Todo el documento</p> <p>— — — — —</p>	11-13
X	<p>SZCZYGIEL MONIKA A ET AL : "Combination of di thi othreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage . "</p> <p>BIOLOGY OF REPRODUCTION . NOV 2002 ,</p> <p>vol . 67, no . 5 , Noviembre 2002 (2002-11) ,</p> <p>Paginas 1532-1537 , XP002343633</p> <p>ISSN : 0006-3363</p>	14 , 15
Y	<p>Todo el documento</p> <p>-- //</p>	3-6

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2005/000187

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	<p>LABETA M 0 ET AL: "SOLUBILIZATION EFFECT OF NONIDET P-40 TRITON X-100 AND CHAPS IN THE DETECTION OF MHC-LIKE GLYCOPROTEINS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 112, no. 1, 1988, paginas 133-138, XP002343634 ISSN: 0022-1759 Todo el documento</p>	3-6, 15
Y	<p>SOTOLONGO BARBARA ET AL: "Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA." BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 69, no. 6, Diciembre 2003 (2003-12), pages 2029-2035, XP002343635 ISSN: 0006-3363 Todo el documento</p>	3-6, 15

Información relativa a miembros de familias de patentes

PCT/IB2005/000187

US 5801058	A	01-09-1998	FR	2721405 A1	22-12-1995
------------	---	------------	----	------------	------------